

腹水肝癌細胞のグリコーゲン代謝

著者	渡辺 民朗
号	200
発行年	1963
URL	http://hdl.handle.net/10097/17827

氏 名 わた 渡 なべ 辺 みん 民 ろう 朗

授 与 学 位 医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 3 8 年 3 月 2 6 日

学 位 授 与 の 根 拠 法 規 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項

研 究 科 , 専 攻 の 名 称 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科

内 科 学 系

学 位 論 文 題 目 腹 水 肝 癌 細 胞 の グ リ コ ー ゲ ン 代 謝

指 導 教 官 東 北 大 学 教 授 海 老 名 敏 明

論 文 審 査 委 員 東 北 大 学 教 授 海 老 名 敏 明

東 北 大 学 教 授 岡 捨 己

東 北 大 学 教 授 菊 地 吾 郎

論文内容要旨

研究目的

近年腫瘍組織の生化学的研究においてGreenstein等の考えていた腫瘍細胞に特有な統一した概念に対し種々の反例が示されてきた。例えばMorris肝癌における解糖及びTryptophane pyrrolase活性等に関してである。一方癌細胞における糖代謝でGlycogen量が減少している事が特徴であり、種々の研究により確認されている。然し今迄の研究は腫瘍細胞の内その発生の不明なものについても研究材料として使用してきた。そこで本研究において起源の明らかな細胞を使つた。即ち吉田等の樹立したDimethylaminoazobenzeneの投与による肝癌の腹水化されたAscites Hepatoma (AHと略す) 66FとAH130の両細胞を使い、Glycogenを中心とした代謝に関しIsotopeによるそのturnover rateを調べ、二三のGlycogenesis系の酵素活性を追究し両細胞間の差異に関し研究した。

研究方法及びに結果

1) Glycogen含量; Bell&Youngの方法による熱水抽出とHassid&Abrahamの方法によるAlkali抽出法により定量した。熱水抽出で正常肝は $0.25\mu\text{moles Glucose/mg. N}$, AH66F及びAH130は各々6.1, 0.0094の値を示した。又Alkali抽出で正常肝3.4, AH66FとAH130は2.4, 0.0033の値を示した。腫瘍細胞をラット腹腔内に移植し経日的にそのGlycogen量を定量すると、AH66Fは3~7日においてAH130の7~10日目のに比し明らかに多い含量を示した。2) Glycogenの濾紙chromatography; 腫瘍細胞Glycogenを酸加水分解し正宗等の方法により濾紙上に展開した。その結果はGlucoseのSpotのみを確認し得た。3) $^{14}\text{C}-(\text{u})\text{-Glucose}$ のGlycogenへの転入; 嫌氣的条件においてWarburg容器内で実験した。即ちGlucose 0.1mmoleを加えた液を 37.5°C で振盪、経時的にそのGlycogen量を測定し、その放射活性は蒸留水で48時間透析後Weinhouseの方法により酸化して BaCO_3 として測定した。Glycogen量はAH66Fで減少し、AH130で僅かに増加している。 ^{14}C のturnoverをみるとAH130はAH66Fに比し明らかに大であつた。又好氣的条件でAH66FはAH130と同様に時間と共に増加し、そのturnoverは嫌氣的条件と同様であつた。4) $^{14}\text{C}-(\text{u})\text{-Glucose}$ で標識されたGlycogenの分解; 好氣的条件で $^{14}\text{C}-(\text{u})\text{-Glucose}$ を細胞と共に加え、 37.5°C 30分反応し、後その細胞を遠心洗滌し再びWarburg容器内で振盪後、経時的にGlycogen量及びその放射活性を調べた。その結果AH66Fで60分後もGlycogen量に対する比放射活性は変らないが、AH130で反応開始時に比し27.2%に減少した。5) Glucose添加時の呼吸並びに解糖活性; Warburg検圧法によりGlucose 0.1mmoles, $^{14}\text{C}-(\text{u})\text{-Glucose}$ 10^4CPm をKrebs-Ringer phosphate Bufferに加え好氣的条件で測定した。

又 Phosphate Buffer の代りに Bicarbonate を使用し嫌氣的解糖活性を乳酸の生成量で測定した。AH66F と AH130 で O_2 消費は $0.71, 0.69 \mu l O_2 / mg. N / hr.$ であり、 Q_L^{OR} は $0.037, 0.041 \mu mole$ 乳酸 $/ mg. N / hr.$ を示し、 Q_L^{NP} は $0.109, 0.152$ を示した。又 ^{14}C -Glucose から $^{14}CO_2$ への転入は $0.17, 0.34 CPM / mg. N / hr.$ であつた。6) Glucose Kinase, Phosphoglucumutase, Glycogen Phosphorylase; Glucose Kinase 活性は山羽の方法により Homogenate を $30^\circ C$ 零次反応で、10 分後の Glucose の減少量を Somogyi-Nelson の方法で定量した。正常肝は $0.31 \mu moles / mg. N$, AH66F は 4.4 , AH130 は 2.9 を示した。Phosphoglucumutase は粗酵素液として Waring blender で破壊した後 $4 \times 10^4 \times 60$ 分の遠心上澄液を使用した。活性は Najjar の方法により $30^\circ C$ 5 分後の代謝された Glucose-1-磷酸を Fiske-Subbarow の高橋の変法で測定した。正常肝は $8.9 \mu moles$ 無機磷 $/ mg. N$ 蛋白, AH66F は 2.3 , AH130 は 0.97 である。Phosphorylase は Sutherland の方法により粗酵素液として遠心上澄液を使用し、 $37^\circ C$ 10 分後の無機磷の産生を測定した。正常肝は $1.7 \mu moles / mg. N$ 蛋白, AH66F は 0.63 , AH130 は 3.1 の活性を示した。

考 按

腫瘍細胞の Glycogen 量の著減とその合成系の低い事は、Nigam によると Phosphorylase は正常肝と略同様にあるが Phosphoglucumutase と Glycogen Synthetase の活性低下のためといひ、Nirenberg は Dephosphophosphorylase の減少を伴う Phosphorylase の減少によるとの両論がある。然し同一系の細胞で比較したのではないので、本研究は同一起源を持つ腹水肝癌細胞を正常肝細胞と対比しつつ研究した。この結果は AH66F 細胞で正常肝に比し Glycogen 量が腫瘍の特性を示さず多量に存し、AH130 は低値を示した。又 AH130 は AH66F に比し turnover rate は明らかに大で、Glucose を加えた両細胞の呼吸並びに解糖活性には著明な差がなかつた。他方酵素活性は AH130 で Phosphorylase 活性が正常肝より高く、AH66F は低く、Phosphoglucumutase は両細胞共に低下している。結局 AH66F は turnover rate が低下しているために Glycogen は貯溜し、AH130 はそれが大なるために Glycogen 量が減少しているものと思われる。

結 論

1) AH66F は AH130 に比し著明に Glycogen 量が大で、その差は移植後の日数でも両者の間に認められた。2) ^{14}C -Glucose の Glycogen への転入は嫌氣的好氣的条件下でも AH130 の turnover が AH66F のそれに比し大で、標識された Glycogen の分解も前者が大である。3) Glucose を基質とした呼吸並びに解糖には著明な差はない。4) Glucose kinase, Phosphoglucumutase は両者に差はなく、Phosphorylase は AH130 で AH66F よりもかなり大であつた。結局 AH130 は AH66F に比し turnover rate の大なるために Glycogen 量が減少しているものと思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

著者は DAB 肝癌の腹水化により樹立した腹水肝癌細胞 AH66F と AH130 を使用し、両細胞と正常肝細胞を比較しつつ、細胞内の Energy 生成系に關与する Glycogen 代謝に關し考察を加えた。

従来 DAB 肝癌発生課程及び癌細胞において Glycogen 含量の著減が多くの研究者によつて認められているが、著者の実験は AH66F 細胞が熱水及びアルカリ抽出により今迄の腫瘍細胞の例とは異なりかなり多い含量を示している。これに反し AH130 細胞は低い含量を示した。又この事実は移植後の経過を追つて調べても定量可能な腹水を採取出来る範囲内で両細胞共同様な結果を示した。著者は又この腫瘍細胞の Glycogen 分割を Glucose よりなる多糖体である事を濾紙クロマトにより確認した。

次に著者は $^{14}\text{C}-(\text{u})-\text{Glucose}$ を使用して肝癌細胞内の Glycogen の Turnover Rate, 呼吸並びに解糖活性, そして Glycogenesis の酵素の内 Glucokinase, PhosphoGlucose mutase, Glycogen Phosphorylase を調べた。其の結果 Glycogen 含量の多い AH66F 細胞は Glycogen 含量の少ない AH130 に比し Glucose を基質とした好氣的及び嫌氣的解糖活性は同様であるが, Glycogen における Turnover Rate, $^{14}\text{C}-\text{Glucose}$ から $^{14}\text{CO}_2$ の産生, そして Glycogen Phosphorylase 活性は各々低値を示す事, 正常肝に比し Glucokinase は両細胞共高値であり, 且 PhosphoGlucose mutase は低値を示す事を証した。

Nireuberg や Nigam の間では癌細胞の低い Glycogen 量はその DephosphoPhosphorylase の減少を伴う Glycogen Phosphorylase の減少によるか, 又は UDFG-Glycogen Transglucosylase の減少によるのかとの二説がある。著者は Glycogen Phosphorylase を測定し Glycogen 蓄積はこの活性と逆の關係にあり, Glycogen Phosphorylase が Glycogen 分解の主役と考えると, その活性の差により Glycogen 量 が 変 化 する と 考 へ て 居 る。又これは $^{14}\text{C}-(\text{u})-\text{Glucose}$ を使用した場合の Glycogen の Turnover Rate の実験結果と一致する。即ち Glycogen 量の少ない細胞はその Turnover Rate が高いとの事実と一致すると論じている。

著者の比論文は各種癌細胞が組織学的所見の異なる様に其代謝も多様性を示す事を実証した価値ある論文である。

よつて本論文は学位を授与するに値するものと認める。